Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
ehem. Direktor: Hofrat Professor Dr. med. W. Dick

VERGLEICH 20%, 22% UND 30% RINDERALBUMIN-LÖSUNGEN IN IHRER VERWENDUNG ALS KONGLUTININ BEI DER KREUZPROBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Raff
aus Stuttgart

1969

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
ehem. Direktor: Hofrat Professor Dr. med. W. Dick

VERGLEICH 20%, 22% UND 30% RINDERALBUMIN-LÖSUNGEN IN IHRER VERWENDUNG ALS KONGLUTININ BEI DER KREUZPROBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Raff
aus Stuttgart

1969

Dekan:	Professor Dr. J. Hirschmann
1. Berichterstatter:	Dozent Dr. W. Schneider
2. Berichterstatter:	Hofrat Professor Dr. W. Dick

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gliederung

	Seite
1. Blutgruppen allgemein	2-3
2. Blutgruppenantigene und -antikörper	4-9
a) Antigene	
b) Antikörper	
c) Antigen-Antikörper-Reaktion	
3. Methoden der Antikörperbestimmung	10-11
a) Kochsalzagglutination	
b) Anti-Humanglobulin-Test ("Coombs"-Test)	
c) Enzymtest	
d) Albumintest	
4. Fragestellung der Arbeit	12-15
a) Versuchsmethode	
b) Versuchstechnik	
5. Versuchsergebnisse	16-39
a) Erläuterungen	
b) Besprechung der Ergebnisse: Versuchsreihe 1 (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender), Tabellen 1, 2, 5. Versuchsreihe 2 (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders), Tabellen 3, 4, 5.	
c) Besprechung der Ergebnisse: Versuchsreihe 3 (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender), Tabellen 6, 7, 10, 11, Abb.-Tab. 12. Versuchsreihe 4 (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders), Tabellen 8, 9, 10, 11, Abb.-Tab. 12.	
6. Diskussion	40-42
7. Zusammenfassung	43-44
8. Literaturverzeichnis	45-47

1. Blutgruppen allgemein

Seit der Entdeckung von Agglutinationserscheinungen im normalen menschlichen Blut durch Landsteiner im Jahr 1901 (1,2 nahm die Blutgruppenforschung ihren Anfang. Man erkannte, daß es eine Reaktion der natürlichen Blutgruppenantikörper des ABO-Systems mit den entsprechenden Antigenen der Erythrocyten war. Ein weiterer, bedeutender Schritt war die Entdeckung der Rhesusfaktoren durch Landsteiner und Wiener (3). Bis heute sind bereits 36 klinisch wichtige Antigene beschrieben, die in 11 Systemen zusammengefasst werden. Der Einzelerythrocyt kann bis zu 28 untereinander verschiedene Blutgruppeneigenschaften tragen, die in über 6 x 10^6 verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten vorkommen können (4). Besonderes klinisches Interesse kommt den folgenden Gruppen zu: ABO, Rh, Kell, Kidd, Lutheran und Duffy. Die Übertragung von Blut dieser Gruppen auf inkompatible Empfänger durch Bluttransfusionen oder Schwangerschaften kann zu folgenschweren Immunisierungen führen. Nachgewiesen werden die Blutgruppenantigene der Erythrocyten entweder durch eine Agglutinationsreaktion mit dem Serum, dessen Antikörper bekannt sind oder durch den Anti-Humanglobulin-Test. Umgekehrt lassen sich die Antikörper auch nachweisen durch Erythrocyten mit bekannten Antigenen. Serumantikörper können auch noch nachgewiesen werden durch die Immunelektrophorese. Jedoch ist dieses Verfahren zu aufwendig, um großen praktischen Wert zu haben. Hingegen kommt der Agglutinationsreaktion überragende Bedeutung zu, da die meisten gebräuchlichen Methoden zum Nachweis der Blutgruppenantigene und -antikörper sich diese Eigenschaft zunutze machen. Angesichts der immer häufigeren Übertragung von Vollblut und des immer größeren Anwendungsbereiches solcher Transfusionen erscheint eine umfassende und zuverlässige Bestimmung der Blutgruppenzugehörigkeit und der -antikörper immer dringender geboten.

Die 'Deutsche Gesellschaft für Bluttransfusion' hat Richtlinien ausgearbeitet, die für den transfundierenden Arzt verbindlich sind. Sie sehen vor, daß vor jeder Transfusion festgestellt werden muß, ob im Serum des Empfängers Antikörper enthalten sind, die gegen die Erythrocyten des Spenders ge-

richtet sind (21). Dazu wird im allgemeinen eine sogenannte Kreuzprobe vorgenommen, wobei Serum des Empfängers mit Erythrocyten des Spenders (mayor-test) und Serum des Spenders mit Erythrocyten des Empfängers (minor-test) konfrontiert werden. Auf den minor-test kann verzichtet werden, da eine ABO-Inkompatibilität sich im mayor-test anzeigt. Außerdem wird bei der serologischen Untersuchung des Spenders üblicherweise auf das Vorhandensein sonstiger, irregulärer oder immunogener Antikörper geachtet. Der minor-test ist deshalb nur bei Kleinstkindern erforderlich, da in den ersten Lebensmonaten die Iso-Antikörper fehlen.

Eine gute Kreuzprobe muß also in der Lage sein, reguläre und irreguläre, immunogene Antikörper nachzuweisen, die gegen die Erythrocyten des Blutes gerichtet sind, das man transfundieren möchte. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ist es unerläßlich:

1. die vorkommenden Blutgruppenantigene und -antikörper immer genauer in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften zu erforschen und
2. Verfahren zu finden oder zu verbessern, die mit größtmöglicher Sicherheit zumindest die wichtigsten und gefährlichsten Antikörper, besonders die des Rh-Systems, erkennen lassen, ohne durch einen zu grossen Zeitaufwand oder eine komplizierte Technik oder durch eine schlechte Ablesbarkeit geringen praktischen Wert zu haben.

2. Blutgruppenantigene und -antikörper

a) Blutgruppenantigene:

Unter Antigenen versteht man allgemein Substanzen, die in einem Organismus, der sie als körperfremd erkennt, eine Antikörperbildung hervorrufen. Man unterscheidet zwischen:

1. natürlichen Antigenen: natürlich vorkommende Kohlenhydrate und Aminosäuren, auf die diese Definition zutrifft,
2. künstliche Antigene.

Das morphologische Substrat der Blutgruppeneigenschaften sind bestimmte makromolekulare Strukturen, die in die Oberfläche der Erythrocyten eingebettet sind. Auch an der Oberfläche der Thrombocyten und Leukocyten sind bis jetzt schon Antigene der Blutgruppen A, B, 0 und und Rh (D) nachgewiese (11), und es ist zu erwarten, daß sich auch die übrigen Blu gruppenantigene dort finden lassen. Jedoch ist die Bedeutun der außererythrocytären Blutgruppenantigene, die auch noch in bestimmten Körpersekreten nachgewiesen werden, von untergeordneter Bedeutung.

Bei den Blutgruppenantigenen handelt es sich meist um kohlenhydrat- und aminosäurehaltige Strukturen, die sich in chemisch reiner Form isolieren lassen. Das allerdings ist bis jetzt ein Problem, das noch nicht für alle Blutgruppenantigene experimentell gelöst ist. Diese Antigene sind als integrierende Membranbestandteile in die mosaikartige Oberflächenschicht der Erythrocyten, die aus Lipid- und Eiweißstrukturen besteht, eingefügt. Sie stellen damit primäre Bestandteile der Zellmembran dar. Die Lewis-Eigenschaft dagegen scheint insofern eine Sonderstellung einzunehmen, als sie offenbar aus dem Serum an die Erythrocytenoberfläche adsorbiert wird (9). Die Blutgruppensubstanzen stellen makromolekulare Komplexe dar mit Molekulargewichten von 2-3 x 10^{7} (10).

Die Blutgruppensubstanzen lassen sich immunologisch und chemisch als Produkt eines oder mehrerer Gene charakterisieren Je nachdem ob der Genotyp des Erythrocyten homo- oder heterocygot ist, finden sich mehr oder weniger Receptoren auf der

Erythrocytenoberfläche. Durch Einführung der Isotopenmarkierung der Antikörper konnte beispielsweise durch direkte Messung bei inkompletten Rh-Antikörpern nachgewiesen werden, daß bei homocygoten Rh(D)-Erythrocyten 10 300 und bei heterocygoten Rh(D)-Erythrocyten 6 400 Antigen-D-Receptoren sich auf der Oberfläche des Erythrocyten vorfanden (13, 17). Von daher ist es auch verständlich, daß die Stärke einer positiven Reaktion auch vom Genotyp der Erythrocyten abhängt. So zeigt ein Erythrocyt des Genotyps cde/cde mit Anti-c eine viel stärkere Reaktion als Erythrocyten des Genotyps CDe/cde. Es ist einleuchtend, daß die bei der Kreuzprobe verwandten Seren, Konglutinine und Globuline, so beschaffen sein müssen, daß auch bei schwachen heterocygoten Erythrocyten noch ein positiver Ausfall der Proben sich ergibt.

b) Antikörper:

Die Antikörper sind Globulin-Eiweiße, die einen Teil der Serumglobuline darstellen. Sie können aber auch in anderen Körpersekreten vorkommen. Die meisten Blutgruppenantikörper sind der Fraktion der Gamma-Globuline zuzuordnen. Von den übrigen Serumglobulinen lassen sie sich durch die Immunelektrophorese abgrenzen. Die Bildung solcher Antikörpermoleküle setzt ein, wenn der Körper ein anders strukturiertes Zellprofil als körperfremd erkennt. In welcher Weise das geschieht, läßt sich heute noch nicht mit Sicherheit sagen. Die neue Zelloberfläche könnte beispielsweise die spezifische Bildung von angepaßten Eiweißmolekülen bewirken, indem bereits vorhandene Eiweißstrukturen sich an die neue Oberfläche anpassen. Pauling hatte 1940 diesen Mechanismus zur Erklärung der Antikörperbildung herangezogen (12) und vermutet, daß sich bereits vorhandene Gamma-Globuline durch Umfaltung an die fremde antigene Struktur anpassen. Diese Darstellung konnte bislang allerdings durch Experimente nicht gestützt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die fremde Zelle als Ganzes phagozytiert wird und so als Matrix für die Synthese bzw. Sekundär- und Tertiärbildung der Proteinmolekülstruktur dient. Vielleicht aber bewirkt die fremde Zelle nur eine vermehrte Bildung bereits

vorhandener Antikörpermoleküle, die schon während der Embryonalzeit auf mutagenem Wege vorgebildet wurden (6). Entsprechend dieser Selektionstheorie der Antikörperbildung würden die verschiedenen Globulinmoleküle durch hohe Mutabilität eines oder mehrerer Gene vor der Geburt entstehen. Im Laufe eines praenatalen Selektionsvorganges werden vom Körper alle die Antikörper ausgemerzt, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind (Immuntoleranz).

Es scheint heute gesichert zu sein, daß die Antikörper bivalenter Natur sind, d.h. sie tragen zwei combining sites in der Größenordnung von etwa 700 Å mit denen sie sich an antigene Strukturen anheften, damit liegt die Größe einer combining site unter 1% der Oberfläche eines Gammaglobulins vom Molekulargewicht 160 000 (7). Neuere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß natürlich vorkommende Iso-Antikörper ein höheres Molekulargewicht besitzen als Immunantikörper (14). So gehören reguläre Isoagglutinine, unspezifische Kälteagglutinine und in Durchbrechung der Regel auch das bei Rh-Sensibilisierung nicht selten in Begleitung der inkompletten Antikörper auftretende komplette Anti-Rh zur Klasse der 19 S (Svedberg-Einheiten) Gammaglobuline, während Rh-, sowie immunogene A und B Antikörper als 7 S Gammaglobuline ein Molekulargewicht von etwa 150 000 besitzen.

Bei den kompletten Antikörpern, zu denen die Isoantikörper des ABO-Systems gehören, tritt eine Agglutination schon im Kochsalzmilieu ein. Dagegen lassen sich inkomplette Antikörper erst nach Anwendung bestimmter Techniken erkennen. Man teilt die Antikörper in folgende Gruppen ein:

1. Antikörper, die bereits im Kochsalzmilieu agglutinierend wirken.
2. Inkomplette Antikörper, die sich im Albumin-, Anti-Humanglobulin- oder Enzymtest nachweisen lassen.
3. Inkomplette Antikörper, die nur im Anti-Humanglobulin und im blocking-test reagieren.

Ein Serum, das untersucht wird, kann Antikörper derselben Spezifität enthalten, die aber aufgrund ihrer unterschied-

lichen Struktur jeweils einer anderen Gruppe zugeordnet werden müssen. Durch vergleichende Untersuchungen desselben Serums mit verschiedenen Techniken lassen sich die verschiedenen Antikörpergruppen darstellen.

c) Antigen-Antikörper-Reaktion:
Die ökonomischste und einfachste Weise, die als fremd empfundenen Zellen zu entfernen, ist die der Agglutination. Dadurch, daß die Zellen bivalente Antikörper an ihrer Oberfläche anlagern und sich dabei zusammenklumpen, ist nicht nur der Stoffwechsel erheblich gestört, sondern auch die Erfassung weiterer Zellen mit gleichen antigenen Eigenschaften gewährleistet und der Abbau oder die Eliminierung aus dem normalen Zellverband eingeleitet. Der Vorgang der Antigen-Antikörper-Reaktion an der Erythrocytenoberfläche kann nach Hummel wie folgt beschrieben werden (15): infolge der Wärmebewegung treffen Antigen und Antikörper umso häufiger zusammen, je mehr davon im Blut vorhanden sind. Die Zahl der zur spezifischen Reaktion führenden Zusammenstöße steigt mit der Avidität der Reaktionspartner an. Umgekehrt bleibt der Anteil nicht gebundener oder wieder frei werdender Teilchen umso größer, je weniger abgestimmt, also unspezifischer das System ist. Die Adsorption hochavider Antikörper, wie etwa Anti-A und Anti-D folgen dabei offensichtlich dem Massenwirkungsgesetz in seiner einfachen Form. Mit abnehmender Affinität werden die Adsorptive immer mehr abweichen von den Beziehungen des Massenwirkungsgesetzes und mit geringerer Haftfestigkeit an die Erythrocyten gebunden. Jedem System kommt dabei offenbar eine bestimmte Temperatur zu, bei der fast alle Reaktionspartner miteinander verbunden und eine andere, bei der alle getrennt sind. Die beiden Temperaturgrade liegen umso höher, je besser ein System abgestimmt ist. So sind beispielsweise die unspezifisch reagierenden, gewöhnlichen Kälteagglutinine bei Körpertemperatur unwirksam, was zum Teil auch für die natürlich vorkommenden Isoantikörper gilt. Ihr thermisches Agglutinationsoptimum liegt unter 25°C, bei den Kälteagglutininen nahe 0°C. Im Gegensatz dazu liegt das thermische Agglutinationsoptimum der sogenannten Immun-Antikörper, die auf einen definierten Antigenreiz hin sich

gebildet haben, bei Körpertemperatur. Die Dynamik der Adsorption und Deduktion läßt auch das Phänomen der Transgression, d.h. die Fähigkeit der Antikörper, mit mehreren Erythrocyten nacheinander zu reagieren, verstehen. Dabei ist bemerkenswert, daß auch ein kurzfristiger Kontakt des Antikörpers mit dem erythrocytären Receptor genügt, um seine Lebenszeit in vivo zu verkürzen.

Für die Immunagglutination darf heute als gesichert gelten, daß sich polyvalente, korpuskuläre Antigene durch bivalente Antikörper zu einem Netzwerk verbinden. Die Reaktion mit dem Antigen kommt durch eine räumlich genau dem Antigen angepasste Aminosäure- und Peptidkonfiguration der Antikörperglobuline zustande. Der Zusammenhalt ergibt sich aus dem Wirken von Nebenvalenzen und van der Waal'schen Kräfte. Sogenannte inkomplette Agglutinine, die bislang als univalent angesehen wurden, besitzen ebenfalls zwei, allerdings nur sehr schwach bindende Valenzen. Jede spezifische Agglutination läßt zwei Reaktionsschritte erkennen: zunächst bindet sich der Antikörper mit einer Valenz an das erythrocytäre Antigen. In der zweiten Phase vollzieht sich die Agglutination, indem sich die zweite Valenz des Antikörpers mit dem Receptor einer Nachbarkorpuskel verbindet. Inkomplette Antikörper agglutinieren erst in Gegenwart von Konglutininen. Die Agglutination durch inkomplette Antikörper im Kochsalzmilieu bleibt deswegen aus, weil die Antikörper zu klein sind, die Ladung der Erythrocyten zu hoch und der Receptor zu tief in die Oberflächenmatrix eingebettet ist. Durch entsprechende Vorbehandlung der Erythrocytenoberfläche lassen sich inkomplette in komplette, d.h. agglutinierende Antikörper umwandeln und aus kompletten lassen sich inkomplette Antikörper herstellen, wie Ceppellini und Landy (16) in entsprechenden Versuchen nachwiesen. Durch enzymatischen Abbau der Erythrocytenoberfläche oder durch Verwendung anisometrischer, hochmolekularer, negativ geladener Moleküle (Albumin, Dextran oder Kollidon) lassen sich die inkompletten Antikörper im Agglutinationstest erkennen. Die Antiglobulinseren wirken als Antikörper gegen Plasmaproteine, zumeist gegen Gammaglobuline, die sie durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion agglutinieren.

Eine häufige Fehlerquelle der Kreuzprobe ist die Pseudoagglutination. Sie unterscheidet sich von der echten Agglutination dadurch, daß ein in Wirklichkeit nicht vorhandenes Agglutinin durch Veränderung der Plasmastrukturen vorgetäuscht wird. Morphologisch ist die Geldrollenbildung charakteristisch. Bei sehr starker Reaktion treten allerdings auch Klumpen auf, die zunächst wie die der echten Agglutination aussehen. Sie können durch Zusatz eines Tropfens Kochsalzlösung auf den Objektträger und leichtes Rühren aufgelöst werden. Das birgt jedoch die Gefahr in sich, daß unter Umständen ebenfalls vorhandene, aber nicht sehr widerstandsfähige echte Agglutinate mit zerstört werden und so ein positives Ergebnis übersehen wird (29).

3. Methoden der Antikörperbestimmung

Die einzelnen Methoden zum Nachweis kompletter und inkompletter Antikörper sind in ihrer Wertigkeit sehr verschieden. Oft entscheiden methodische Fragen und die Herstellung der einzelnen Reagenzien ihren Wert. Außerdem erfassen sie jeweils verschiedene Antikörperfraktionen, was durch vergleichsweise Titration unschwer zu ermitteln ist. Im Laufe der letzten Jahre haben sich nun vier verschiedene Methodengruppen herausgebildet, die kurz besprochen werden sollen:

1. Kochsalzagglutination
2. Anti-Humanglobulin-Test ("Coombs"-Test)
3. Enzymtest
4. Albumintest

a) Kochsalzagglutination:
Sie eignet sich zum Nachweis kompletter Antikörper (z.B. im Bereich des ABO-Systems). Wird ein Serum, das ein spezifisches Agglutinin enthält mit einer Kochsalzaufschwemmung roter Blutkörperchen, die das entsprechende Antigen besitzen, gemischt, so tritt eine Agglutination ein.

b) Anti-Humanglobulin-Test:
Der Anti-Humanglobulin-Test wurde bereits im Jahre 1908 von Moreschi entdeckt. Da Antikörper Serumproteine sind, die hauptsächlich der Globulinfraktion angehören, veranlassen sie bei einem artfremden Tier, dem sie injiziert werden, die Bildung spezifischer Humanglobulin-Antikörper. Diese Antikörper vermögen mit allen menschlichen Globulinmolekülen zu reagieren und sie zu präzipitieren. Sind die menschlichen Antikörper schon an Erythrocyten angeheftet, so werden diese bei der Präcipitationsreaktion mitgerissen, und es entsteht das Bild einer Agglutination.

Der Test wird folgendermaßen ausgeführt: zu einem Serum, das inkomplette Antikörper enthält, werden Erythrocyten mit dem entsprechenden Antigen hinzugegeben. Man inkubiert nun das Serum-Erythrocyten-Gemisch bei 37°C. Anschließend werden die Erythrocyten abzentrifugiert und in NaCl-Lösung gewaschen, um etwaige Plasmareste zu entfernen. Dann wird den Erythrocyten eine Anti-Humanglobulin-Lösung zugesetzt. Sind nun die

Erythrocyten mit inkompletten Antikörpern besetzt, so bewirkt das zugesetzte Anti-Humanglobulin eine Präcipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe nach Art einer Agglutination (indirekter "Coombs"-Test). Beim direkten Anti-Humanglobulin-Test entfällt die Beladung der Erythrocyten mit dem Antikörper des fremden Serums, da sie bereits in vivo mit inkompletten Antikörpern besetzt wurden, wie es bei Kindern mit Neugeborenen-Erythroblastose der Fall ist. Durch die verschiedenen Methoden der Herstellung der Anti-Humanglobulin-Seren und die vielfältigen Modifikationen der Technik ist es schwer, die Ergebnisse, die mit dem "Coombs"-Test gewonnen werden, einheitlich zu bewerten. Außerdem liegen Beobachtungen vor (18,8), wonach sich besonders der Albumin-Test teilweise dem "Coombs"-Test an Empfindlichkeit überlegen zeigte.

c) Enzymtest:
Ein weiterer Fortschritt auf dem Weg zum Nachweis inkompletter Antikörper waren die Verfahren, die mit Enzymen arbeiteten mit denen die Blutkörperchen zum Test vorbereitet wurden. Durch Zugabe von Enzymen soll die Erythrocytenoberfläche so weit abgebaut werden, daß mit den im Serum vorhandenen inkompletten Antikörpern eine Agglutination zustande kommt. Meist werden heute die Enzyme Papain, Bromelin und Ficin verwandt. Jedoch lassen sich die Enzymteste nicht überall anwenden, da bestimmte Receptoren durch die Fermentmethode zerstört werden.

d) Albumintest:
Durch Zugabe hochmolekularer Lösungen zu einem Serum, das inkomplette Antikörper enthält, kann die Agglutination entsprechender antigenhaltiger Erythrocyten erreicht werden. Von den anfänglich verwandten Substanzen, wie Albumin, Gelatine, Dextran, Kollidon, Gummi-arabicum und AB-Serum, hat sich in den anglo-amerikanischen Ländern vor allem der von Diamond und Denton (19) vorgeschlagene 'Albumintest' eingebürgert. Verwendet wird hauptsächlich 20% und 30% Rinderalbuminlösung. In den europäischen Ländern wird außerdem noch der Gelatine-Test vielfach gebraucht, wobei sich aber der Albumintest immer mehr durchzusetzen beginnt.

4. Fragestellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit sich Unterschiede bei den Kreuzproben ergeben, wenn man Rinderalbuminlösungen verschiedener Konzentration als Konglutinin zusetzt. Vor allem sollte sich die Untersuchung erstrecken auf die Empfindlichkeit der Reaktionen, die Ablesbarkeit der Ergebnisse und das Auftreten störender Nebenreaktionen, wie Geldrollenbildung. Wir wählten dabei die Nachweisreaktionen der Rh(D)-Eigenschaft, weil sich bei dieser Kreuzprobenreaktion die Verwendung konglutinabler Rinderalbuminlösungen überaus brauchbar erwiesen hat. Außerdem hat diese Bestimmung überragende praktische Bedeutung, da Fehlbestimmungen der Rh(D)-Eigenschaft schwerwiegende Immunisierungsvorgänge und Transfusionszwischenfälle nach sich ziehen können.

a) Versuchsmethode:
Geprüft wurden die heute gebräuchlichen 20%, 22% und 30% Rinderalbuminlösungen verschiedener Hersteller. Die Prüfung wurde in 4 verschiedenen Versuchsreihen vorgenommen. Jede Versuchsreihe bestand aus 10 Versuchsgruppen. Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen wurden von den Rinderalbuminlösungen, die miteinander verglichen werden sollten, eine Verdünnungsreihe angesetzt, wobei von jeder Titrationsstufe eine Kreuzprobe gemacht wurde. Insgesamt wurden etwa 2 200 Kreuzproben nach der Konglutinin-Schaukel-Technik nach W. Schneider und etwa 700 Kreuzproben nach der Röhrchen-Technik ausgeführt.

1. Versuchsreihe (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender)
Geprüft wurden vier 20% Rinderalbuminlösungen verschiedener Hersteller. Von einem Anti-D-Serum, das bei allen 10 Versuchsgruppen verwandt wurde, stellten wir mithilfe der einzelnen Rinderalbuminlösungen je eine Verdünnungsreihe her. Von jeder Titrationsstufe wurde nun eine Kreuzprobe angesetzt. Die dazu verwendeten Erythrocyten schwemmten wir in dem Rinderalbumin der entsprechenden Verdünnungsreihe zu einer 2% Suspension auf (die 2% Suspension bezieht sich auf ein Standardblut mit 5×10^6 Erythrocyten mm^3. Die Suspension weist also einen Erythrocytengehalt von 100 000/mm^3 auf). Da es auf einen Empfindlichkeits-

vergleich der Reaktionen ankam, verzichteten wir darauf, die Erythrocyten nach homocygoter oder heterocygoter D-Eigenschaft auszuwählen.

2. Versuchsreihe (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders)
Dieselben vier 20% Rinderalbuminlösungen wurden erneut verglichen. Allerdings verwendeten wir nun für die 12 Versuchsgruppen jeweils verschiedene Anti-D-Seren, die teilweise von Industriefirmen, teilweise aus Blutproben der Blutzentrale stammten. Da sich die Durchführung der Versuche über 3 Wochen hinzog, prüften wir die Agglutinabilität der Erythrocyten durch Kontrollversuche, für die jeweils dasselbe Anti-D-Serum und dieselbe Albuminlösung verwandt wurde. Die Empfindlichkeit der Kreuzproben war am Beginn der Versuchsreihe nicht größer als am Ende.

3. Versuchsreihe (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender)
Bei dieser Hauptversuchsreihe prüften wir drei 20%, vier 22% und sechs 30% Rinderalbuminlösungen. Es wurde genauso verfahren wie bei der ersten Versuchsreihe.

4. Versuchsreihe (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders)
Dieselben Rinderalbuminlösungen der dritten Versuchsreihe verglichen wir nun nach dem für die 2. Versuchsreihe angegebenen Verfahren.

b) Versuchstechnik:
Die Kreuzproben wurden nach dem von W. Schneider (22) vorgeschlagenen Hoch-Protein-Schaukel-Test durchgeführt. Bei den ersten beiden Versuchsreihen wurden die Kreuzproben parallel dazu noch nach der Röhrchen-Technik angestellt, um einen Vergleich zwischen den beiden Techniken zu ermöglichen. Die Erythrocyten stammten aus Blutproben der Blutzentrale, wobei nur rote Blutkörperchen von Spendern der Gruppe O, D positiv verwandt wurden. Die Anti-D-Seren bezogen wir entweder von Industriefirmen oder sie entstammten antikörperhaltigen Blutproben der Blutzentrale.

Aus den Anti-D-Seren wurde nun zusammen mit den Albumin-Lösungen, die geprüft werden sollten, eine geometrische Ver-

dünnungsreihe bis etwa Titer 1 : 1000 hergestellt. Gleichzeitig suspendierten wir noch etwa 0,05 ml des ausgewählten Blutes der Gruppe O, D positiv, in einer entsprechenden Menge der verwendeten Albuminlösung, so daß eine 2% Suspension der Erythrocyten entstand. Die Versuchsbedingungen wurden für alle Versuche konstant gehalten.

1. Hoch-Protein-Schaukel-Test nach W. Schneider:
   Auf einen Objektträger, der vorher gekennzeichnet wurde, brachten wir zwei Tropfen des antikörperhaltigen Serum-Albumin-Gemisches aufeinanderfolgender Titrationsstufen. Es wurde darauf geachtet, möglichst immer gleichgroße Tropfen aufzutragen. Mithilfe eines Glasstäbchens entnahmen wir der 2% Erythrocyten-Suspension einen Tropfen und verrührten ihn mit dem Serum-Albumin-Gemisch so, daß er etwa eine ovale Fläche mit einem Längsdurchmesser von ca. 10 mm bedeckte. Die so vorbereiteten Objektträger wurden nun in einer feuchten Kammer in den Brutschrank gegeben und 30 min lang bei 37°C auf einer rechteckigen Platte ständig leicht auf- und abbewegt mit einer Frequenz von 2,5/sec. Dieses Verfahren, das von W. Schneider vorgeschlagen wird, erbringt eine größere Empfindlichkeit der Kreuzproben, die nach der Objektträgertechnik ausgeführt werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion beginnt sofort nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches. Zur Bildung eines Agglutinates müssen aber die antikörperbeladenen Erythrocyten zueinanderfinden. Dieser Vorgang wird durch das Hin- und Herbewegen des Reaktionsgemisches von außen her unterstützt, wodurch die Empfindlichkeit gesteigert wird.

   Nach der Entnahme der Objektträger aus dem Brutschrank werden sie noch 15 sec leicht hin- und herbewegt und anschließend wird die Reaktion makroskopisch vor einer Lichtquelle beurteilt. Sind Agglutinate auf diese Weise nicht zu erkennen, so erfolgt eine mikroskopische Beurteilung bei mittlerer Vergrößerung. Die Kreuzprobe gilt als negativ, wenn mikroskopisch auch Kleinst-Agglutinate nicht mehr einwandfrei zu erkennen sind.

2. Röhrchen-Technik:

Dem Serum-Albumin-Gemisch, das noch in den Titrationsröhrchen verblieben ist, wird nun ein Tropfen der Erythrocyten-Suspension, etwa 0,03 ml, zugesetzt und dann 30 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend zentrifugierten wir 1 min lang bei 1000 Umdrehungen/min. Vor der makroskopischen Ablesung schüttelten wir den Röhrcheninhalt leicht auf. War makroskopisch keine Agglutination mehr zu erkennen, so wurden bei mittlerer Vergrößerung die folgenden Titrationsstufen noch auf eine positive Reaktion hin untersucht. Diese mikroskopische Beurteilung ist hier, im Gegensatz zur mikroskopischen Beurteilung der Objektträger-Kreuzproben, sehr erschwert und erlaubt daher keine sicheren Aussagen, da die Erythrocyten durch die Zentrifugierung unspezifische Zusammenballungen zeigen.

5. Versuchsergebnisse

a) Erläuterungen:

Bevor wir die Versuchsergebnisse im einzelnen besprechen, möchten wir noch eine Übersicht über die verwendeten Rinderalbuminlösungen geben. Aus naheliegenden Gründen verzichteten wir auf die Nennung der Herstellerbezeichnungen und kennzeichneten stattdessen die Albuminlösungen durch Zahlensymbole. Für die Versuchsreihen 3 und 4 verwandten wir nur solche Rinderalbuminlösungen, die von derselben Herstellerfirma in 20% oder 22% und 30% Konzentration geliefert wurden, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu haben.

Übersicht: 20% 11, 21, 31, 41, 51;
22% 12, 62, 72, 82;
30% 13, 63, 73, 83, 53;

Bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse wurden die erhaltenen Mittelwerte stets zum nächstliegenden Titerwert auf- oder abgerundet. Die Erklärung der verwendeten Zeichen findet sich auf Tabelle Nr. 1.

b) Besprechung der Ergebnisse:

Versuchsreihe 1 (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender), Tabellen 1, 2, 5.
Versuchsreihe 2 (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders), Tabellen 3, 4, 5.

Mithilfe der beiden Versuchsreihen wollten wir herausfinden, inwieweit herstellungsbedingte Unterschiede der Albuminlösungen oder Besonderheiten der Versuchstechnik das Versuchsergebnis beeinflussen.

Wie sehr die Empfindlichkeit der Kreuzproben von der zugesetzten Albuminlösung abhängt, zeigt ein Vergleich zwischen dem Fabrikat 11 und 41 recht deutlich. In der 1. Versuchsreihe (Tabelle 1) zeigt das Fabrikat 11 gegenüber 41 einen um 4 Stufen empfindlicheren Gesamttiter an; hingegen erweist sich in der Versuchsreihe 2 (Tabelle 3) das Fabrikat 41 um 2 Stufen insgesamt empfindlicher als Fabrikat 11. Dieser Vergleich zeigt, wie wenig der Gesamttiter einen eindeutigen Schluß auf die Güte der verwendeten Albuminlösungen zuläßt. Weiterhin konnten wir bei der 2. Versuchsreihe beobachten, daß mithilfe der Albuminlösung 41 (Versuch 5 und 7) bei den verwendeten schwachtitrigen Anti-D-Seren auch dann noch eine positive Reaktion zu erhalten war, wenn die Kreuzproben mit den anderen Albuminlösungen schon ein negatives Ergebnis anzeigten. Wir führen diese Erscheinung auf ein besonders günstiges Verhalten zwischen der Albuminlösung und den antikörperhaltigen Seren zurück. Ob hierbei auch die erythrocytäre Struktur der D-Eigenschaft mitwirkt, läßt sich aus dieser Beobachtung nicht erkennen.

Ein weiteres Ziel der beiden Versuchsreihen war, zu beobachten, inwiefern die Versuchsergebnisse von der angewandten Versuchstechnik beeinflusst werden. Parallel zueinander wurden die Kreuzproben mit dem Konglutinin-Schaukel-Test (Tabellen 1 und 3) und mit dem Röhrchen-Test (Tabellen 2 und 4) durchgeführt. Da beide Kreuzproben-Techniken von denselben Anfangsbedingungen ausgingen, zeigt sich die Überlegenheit des Konglutinin-Schaukel-Tests deutlich, dessen Gesamttiter makroskopisch bei 1 : 95, im Gegensatz zu 1 : 28 beim Röhrchen-Test (Tabelle 5), lag. Die Ursache dafür liegt sicher-

lich in der verfeinerten Versuchstechnik des Konglutinin-Schaukel-Tests und in der besseren Ablesbarkeit begründet. Die Erfahrungen Gathofs (30) konnten wir nicht bestätigt finden: der Röhrchen-Test liefere sicherere Ergebnisse, weil durch das Zentrifugieren die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt werde. Im Gegenteil, wir befürchten, daß hierdurch eine unspezifische Zusammenlagerung der Erythrocyten begünstigt wird. Außerdem ist unserer Beobachtung nach das quantitativ schlecht normierbare Aufschütteln des Kreuzproben-Gemisches nach dem Zentrifugieren der Röhrchen ein erheblicher Unsicherheitsfaktor, da durch das Schütteln entweder die vorhandenen Erythrocyten-Schollen nur ungenügend aufgelöst oder gar schwache Agglutinate zerstört werden. Zudem ist bei den Röhrchen, vor allem die mikroskopische Beurteilung der Kreuzproben, sehr erschwert, wenn nicht unmöglich. Wir haben deshalb bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse in Tabelle 5 darauf verzichtet, die mikroskopisch ermittelten Titerwerte des Röhrchen-Tests miteinzuzeichnen.

Eine weitere Beobachtung, die wir besonders beim Konglutinin-Schaukel-Test machten, weil sie sich hier deutlich erkennen ließ, war das sogenannte 'Pro-Zonen-Phänomen'. In der Literatur wird es vor allem als ein störender Faktor beim "Coombs"-Test beschrieben. Da wir einem Tropfen Albumin-Antikörperserum-Gemisch noch einen Tropfen Erythrocyten-Suspension zusetzten, war von vornherein die Verdünnung des Antikörperserums 1 : 2. Trotzdem konnten wir sehen, wie vor allem in den ersten beiden Titrationsstufen (1:2 und 1:4) die Agglutinate kleiner, teilweise sogar mikroskopisch nur erkennbar waren, als die Agglutinate der nachfolgenden Titrationsstufen. In keinem einzigen Fall unserer Versuche allerdings wirkte sich das 'Pro-Zonen-Phänomen' so stark aus, daß bei Verdünnung des Antikörperserums mit Konglutinin in einem Verhältnis 1 : 1 eine mikroskopisch sichtbare Agglutination der Versuchserythrocyten unterblieben wäre.

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 1. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test (Tabelle 1):

Fabrikat		11		21	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	128	1024	4	128
	2	256	512	16	32
	3	128	256	32	32
	4	32	128	8	64
	5	1024	2048	32	128
	6	128	256	32	64
	7	256	512	32	64
	8	1024	2048	128	256
	9	512	1024	64	128
	10	128	256	32	128
Mittelwert		362	806	38	102

Fabrikat		31		41	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	256	512	16	32
	2	256	512	16	64
	3	1024	1024	32	64
	4	1024	1024	4	8
	5	16	64	32	128
	6	64	128	8	32
	7	16	64	16	64
	8	32	64	4	16
	9	64	128	32	64
	10	8	64	16	64
Mittelwert		276	358	18	54

abelle Nr. 1

Darstellung der Ergebnisse des Koagulations-Schnelltest-Testes der 1. Versuchsreihe

(Verwendung desselben Anti-D Serums und Erythrocyten verschied. Spender)

Titer / Fabrikat		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
Versuchsr.	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
11	6													
	7													
	8													
	9													
	10													
	20													
	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
21	6													
	7													
	8													
	9													
	10													
	20													
	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
31	6													
	7													
	8													
	9													
	10													
	20													
	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
41	6													
	7													
	8													
	9													
	10													
	20													

makroskop. Ablesung

mikroskop. Ablesung

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 1. Versuchsreihe

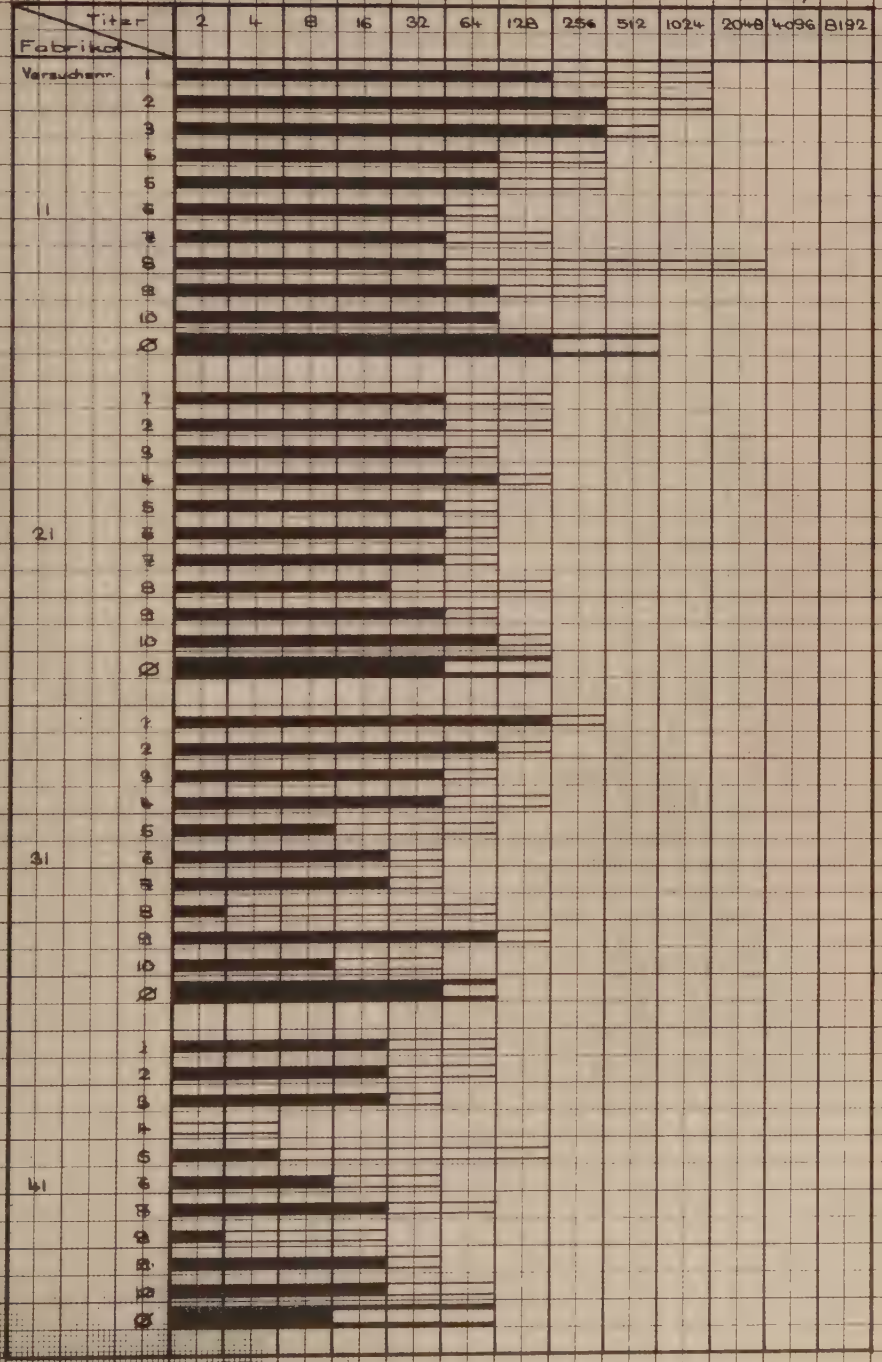
Röhrchen-Test (Tabelle 2):

Fabrikat		11		21	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	128	1024	32	128
	2	256	1024	32	128
	3	256	512	32	64
	4	64	256	64	128
	5	64	256	32	64
	6	32	64	32	64
	7	32	128	32	64
	8	32	2048	16	128
	9	64	256	32	64
	10	64	64	64	128
Mittelwert		99	563	37	96

Fabrikat		31		41	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	128	256	16	64
	2	64	128	16	64
	3	32	64	16	32
	4	32	128	-	4
	5	8	64	4	128
	6	16	32	8	32
	7	16	32	16	64
	8	2	64	2	16
	9	64	128	16	32
	10	8	32	16	64
Mittelwert		37	93	11	50

Tabelle Nr. 9

Darstellung der Ergebnisse des Röhrchen-Tests der 1. Versuchsreihe
(Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschied. Spender)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 2. Versuchsreihe

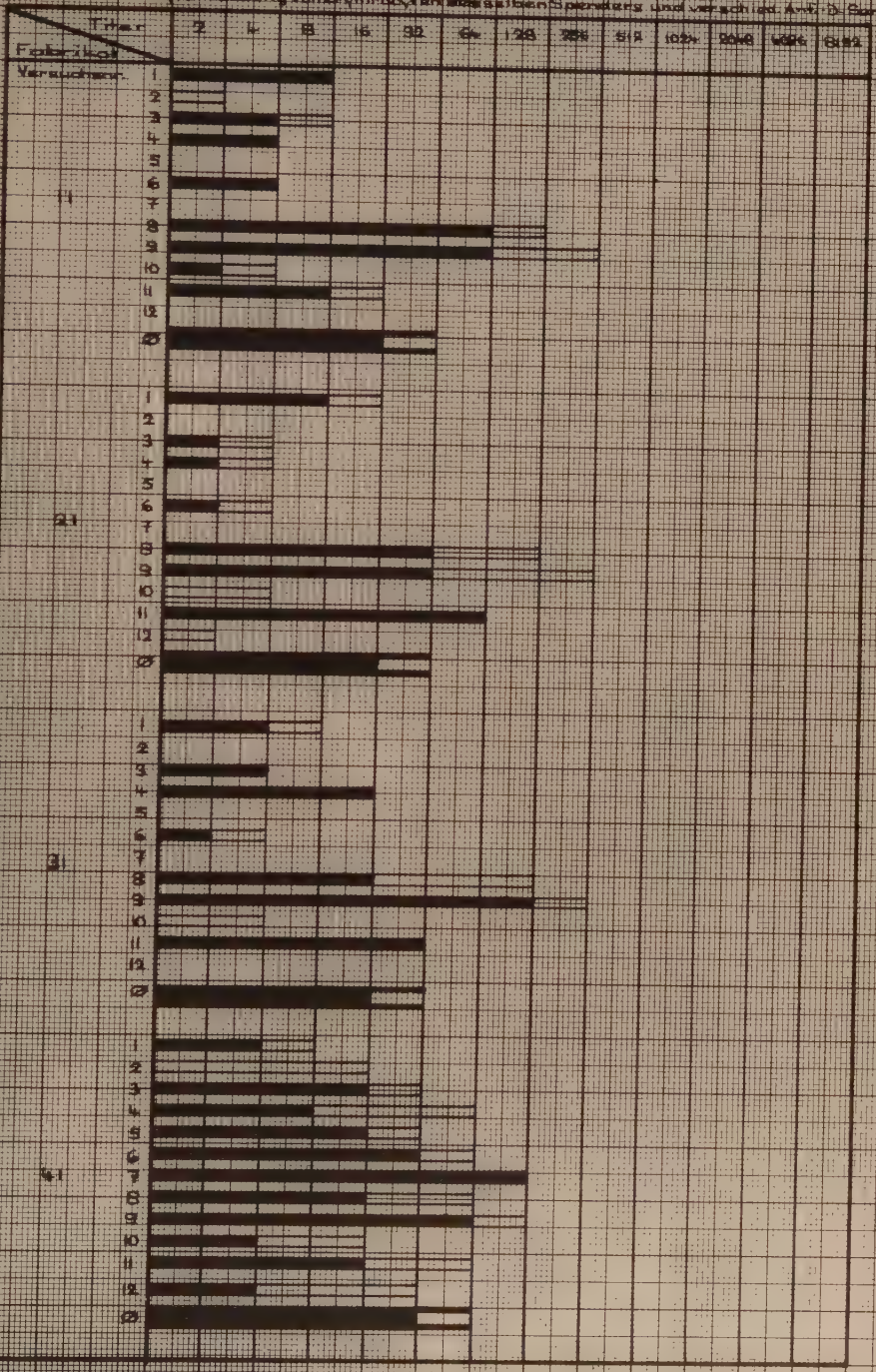
Konglutinin-Schaukel-Test (Tabelle 3):

Fabrikat		11		21	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	8	8	8	16
	2	-	2	-	-
	3	4	8	2	4
	4	4	4	2	4
	5	-	-	-	-
	6	4	4	2	4
	7	-	-	-	-
	8	64	128	32	128
	9	64	256	32	256
	10	2	4	-	4
	11	8	16	64	64
	12	-	-	-	2
Mittelwert		13	36	12	40

Fabrikat		31		41	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	4	8	4	8
	2	-	-	-	16
	3	4	4	16	32
	4	16	16	8	64
	5	-	-	16	32
	6	2	4	32	64
	7	-	-	128	128
	8	16	128	16	64
	9	128	256	64	128
	10	-	4	4	16
	11	32	32	16	64
	12	-	-	4	32
Mittelwert		17	38	26	54

Tafel Nr. 3

Darstellung der Ergebnisse des Komplement-Schwankungs-Tests der 2. Versuchsreihe
(Verwendung von Cytrocystan des selben Spenders und verschied. A.-K. d. Sera)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 2. Versuchsreihe

Röhrchen-Test (Tabelle 4):

Fabrikat		11		21	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	4	8	4	8
	2	-	-	-	-
	3	-	2	-	4
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	2
	7	-	-	-	-
	8	-	16	8	32
	9	-	64	-	64
	10	-	2	-	2
	11	-	8	4	32
	12	-	-	-	-
Mittelwert		0	8	1	12

Fabrikat		31		41	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	4	2	4
	2	-	-	-	4
	3	-	2	4	16
	4	-	2	-	8
	5	-	-	2	16
	6	-	2	4	4
	7	-	-	-	-
	8	8	64	16	64
	9	-	-	16	64
	10	-	2	-	2
	11	-	16	4	32
	12	-	-	-	8
Mittelwert		1	8	4	19

Tabelle Nr. 4

Darstellung der Ergebnisse des Röhrchen-Tests der 2. Versuchsreihe

Verwendung von Erythrocyten desselben Spenders und verschied. Anti-D-Seren

Titer / Fabrikat	Versuchsnr.	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
11	1	■	■	■										
	2													
	3	■	■											
	4													
	5													
	6													
	7													
	8	■	■	■	■	■								
	9	■	■	■	■	■	■							
	10	■	■	■	■									
	11	■	■	■	■									
	12													
	Ø	■	■	■										
21	1	■	■	■										
	2	■	■											
	3	■	■											
	4													
	5													
	6													
	7	■	■											
	8	■	■	■	■	■	■							
	9	■	■	■	■	■	■	■						
	10	■	■	■	■	■								
	11	■	■	■	■	■	■							
	12													
	Ø	■	■	■	■	■								
31	1	■	■											
	2	■	■	■										
	3	■	■	■										
	4	■	■	■										
	5	■	■	■										
	6	■	■	■										
	7													
	8	■	■	■	■	■	■							
	9													
	10	■	■	■	■									
	11	■	■	■	■	■								
	12	■	■	■	■									
	Ø	■	■	■	■									
41	1	■	■											
	2	■	■	■	■									
	3	■	■	■	■	■								
	4	■	■	■	■	■								
	5	■	■											
	6	■	■	■	■									
	7													
	8	■	■	■	■	■	■	■						
	9	■	■	■	■	■	■	■						
	10	■	■											
	11	■	■	■	■	■	■							
	12	■	■	■	■									
	Ø	■	■	■	■	■								

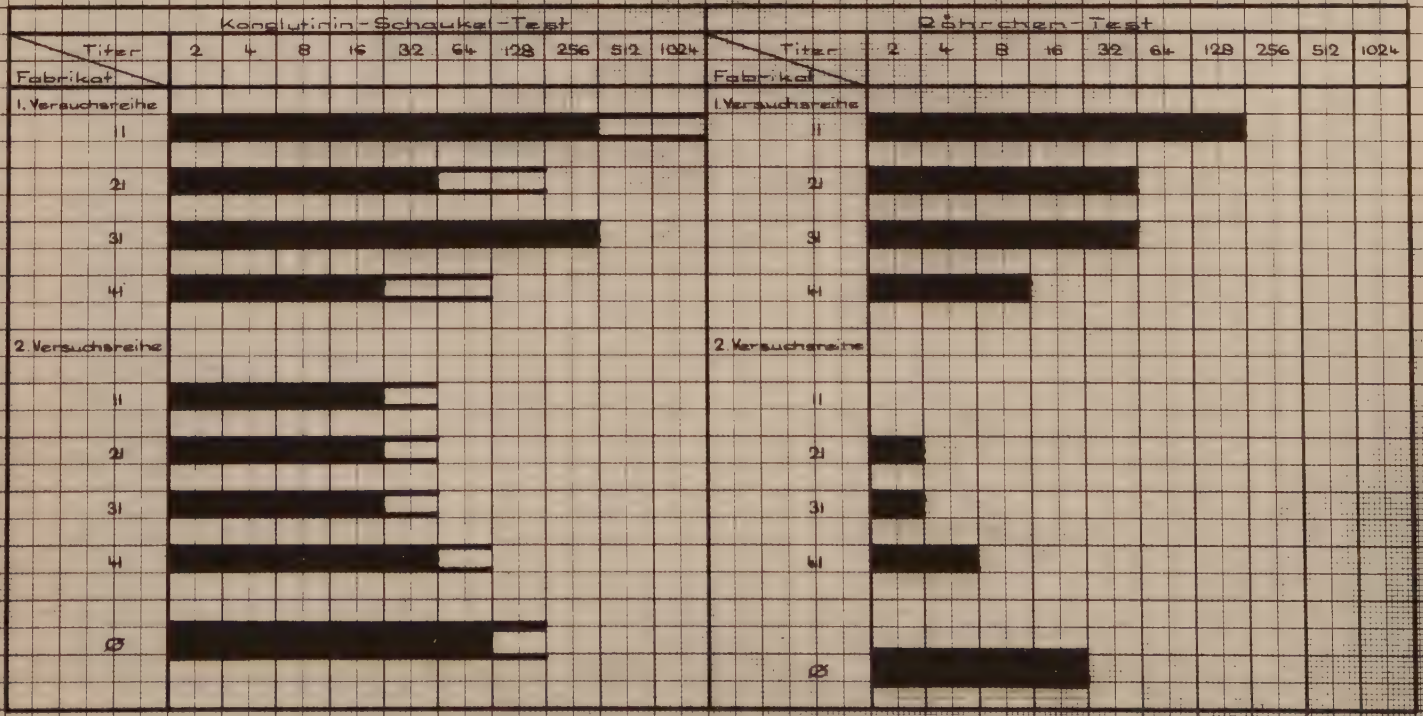
Zusammenstellung der Mittelwerte des Konglutinin-Schaukel-Tests und des Röhrchen-Tests der Versuchsreihen 1 und 2

Vergleich zwischen Konglutinin-Schaukel-Test und Röhrchen-Test (Tabelle 5):

Test		Kongl.-Test		Röhr.-Test	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsreihe 1					
Fabrikat	11	362	806	99	563
	21	38	102	37	96
	31	276	358	37	93
	41	18	54	11	50
Versuchsreihe 2					
Fabrikat	11	13	36	0	8
	21	12	40	1	12
	31	17	38	1	8
	41	26	54	4	19
Mittelwert		95	186	28	106

Tabelle Nr. 5

Zusammenstellung der Mittelwerte des Konglutinin-Schaukel-Tests und des Röhrchen-Tests der Versuchsreihen 1 und 2



c) Besprechung der Ergebnisse:
Versuchsreihe 3 (Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschiedener Spender), Tabellen 6, 7, 10, 1
Versuchsreihe 4 (Verwendung verschiedener Anti-D-Seren un Erythrocyten desselben Spenders), Tabellen 8, 9, 10, 11.

Sie stellen die eigentlichen Hauptversuche dar, die einen Vergleich zwischen 20%, 22% und 30% Rinderalbuminlösungen ermöglichen sollen. Um herstellungsbedingte Unterschiede so weit wie möglich auszuschließen, verwandten wir nur solche Albuminlösungen, die sowohl in 20% oder 22% und 30% Form vom selben Hersteller geliefert wurden. Als Versuchstechnik wählten wir den Konglutinin-Schaukel-Test, der sich in den vorhergehenden beiden Versuchsreihen als am geeignetst erwiesen hatte. Wie bei der Versuchsreihe 2 verwandten wir bei der 4. Versuchsreihe in allen Einzelversuchen Erythrocyten desselben Spenders. Wir wählten dafür die im Versuch 8 der 3. Versuchsreihe verwendeten Erythrocyten aus, da sie ein günstiges Verhalten zeigten. Eine starke Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch eine etwaige besondere antigene Struktur der Erythrocyten, wie das aus dem Ergebnis der 2. Versuchsreihe vermutet werden könnte, war deshalb nicht zu erwarten. Um die Agglutinabilität zu prüfen, da sich die Versuche über 18 Tage hinzogen, wurde der 10. Versuch der 4. Versuchsreihe unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie der Versuch 8 der 3. Versuchsreihe. Dabei zeigte sich, im Gegensatz zu den Kontrollversuchen der Reihe 2, ein leichtes Nachlassen der Agglutinabilität der Erythrocyten. Wir nahmen das in Kauf, da nicht der absolute Titer, sondern das relative Ergebnis der Versuchsreihe für die Arbeit entscheidend war.

Während der Vergleich zwischen den 20% und 22% Lösungen keinen Unterschied zeigt (Tabelle 10), der als charakteristisch für die verschiedenen Konzentrationen gelten könnte, erwies sich im Gegensatz dazu ein recht erheblicher Unterschied im Verhalten der 20%/22% Lösungen gegenüber den 30% (Tabellen 10 und 11). Gegenüber den 20%/22% Rinderalbuminlösungen zeigten die 30% einen makroskopisch und mikroskopisch um 4 Stufen niedrigeren Gesamttiter. Auffallend war außerdem, daß mit der

30% Albuminlösungen zwar stets eine Agglutinationsreaktion zu erhalten war, die jedoch schon auf den unteren Titrationsstufen bald negativ wurde und zudem meist nur mikroskopisch zu erkennen war. Dazuhin war das Ende der Agglutinationsreaktion bei den 30% Lösungen keineswegs so sauber und zweifelsfrei zu erkennen, wie bei den 20%/22%. Begünstigt wurde die schlechte Ablesbarkeit bei den 30% Lösungen noch durch die geringere Sedimentierung der Erythrocyten, so daß die roten Blutkörperchen vielfach durchsichtige Scheibchen darstellten, die nur umrißhaft zu erkennen waren. Im Ganzen machte das den Eindruck, als würde die höhere Viskosität eine deutliche Ausbildung der Agglutination hemmen. In einer vergleichenden Versuchsreihe prüften wir deshalb, ob die Behinderung der Agglutination sich vielleicht durch ein stärkeres Hin- und Herbewegen während der Inkubation vermindern ließe. Wir stellten deshalb mit der Rinderalbuminlösung 13 und einem Anti-D-Serum eine Verdünnungsreihe her. Von 10 verschiedenen Erythrocytensorten wurden nun 2% Suspensionen hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe setzten wir zwei Kreuzproben an. Die erste Kreuzprobe wurde bei normaler Amplitude und 2,5 Bewegungen/sec hin- und herbewegt, die zweite Kreuzprobe bei doppelter Amplitude und 5/sec. Das Ergebnis des Vergleichs ließ keinen Unterschied erkennen.

Eine weitere Beobachtung während der Versuche zeigte uns die Notwendigkeit, zu den Rinderalbuminlösungen gerinnungshemmende Zusätze hinzuzugeben. Parallel zu der Rinderalbuminlösung 31 verwendeten wir in den Versuchsreihen 3 und 4 auch noch die 30% Version dieses Fabrikates. Die Ergebnisse dieser Albuminlösungen waren völlig unbrauchbar, weil sie durch eine starke Pseudoagglutination verfälscht waren (Abb.-Tabelle 12). Daß es sich um Pseudoagglutination handeln mußte, legte sich sehr nahe, da auch bei Verdünnungen über 1 : 16 000 hinaus kein Aufhören der Agglutination zu beobachten war, während die Kreuzproben mit den anderen Albuminlösungen schon bei einem Titer von 1 : 256 das Ende der Reaktion anzeigten. Daß diese scheinbar gesteigerte Empfindlichkeit, um mehr als 6 Titerstufen, durch herstellungsbedingte Unterschiede erklärt werden könnte, erscheint unwahrscheinlich. In geringem Maße

zeigte sich diese Erscheinung auch bei dem Fabrikat 12; sie verschwand jedoch nach Zusatz eines gerinnungshemmenden Mittels (Titriplex^{R}).

Unserer Vermutung nach tritt die Pseudoagglutination beim Vorhandensein eines fibrinogenhaltigen Plasmas auf (27,28). Allerdings reicht dazu der Fibrinogenanteil des verdünnten Vollblutes nicht aus, wie wir bei einem Blindversuch feststellten, bei dem Rinderalbuminlösung mit Erythrocyten vermischt und unter denselben Versuchsbedingungen geprüft wurde. Dabei waren keinerlei Agglutinate zu erkennen.

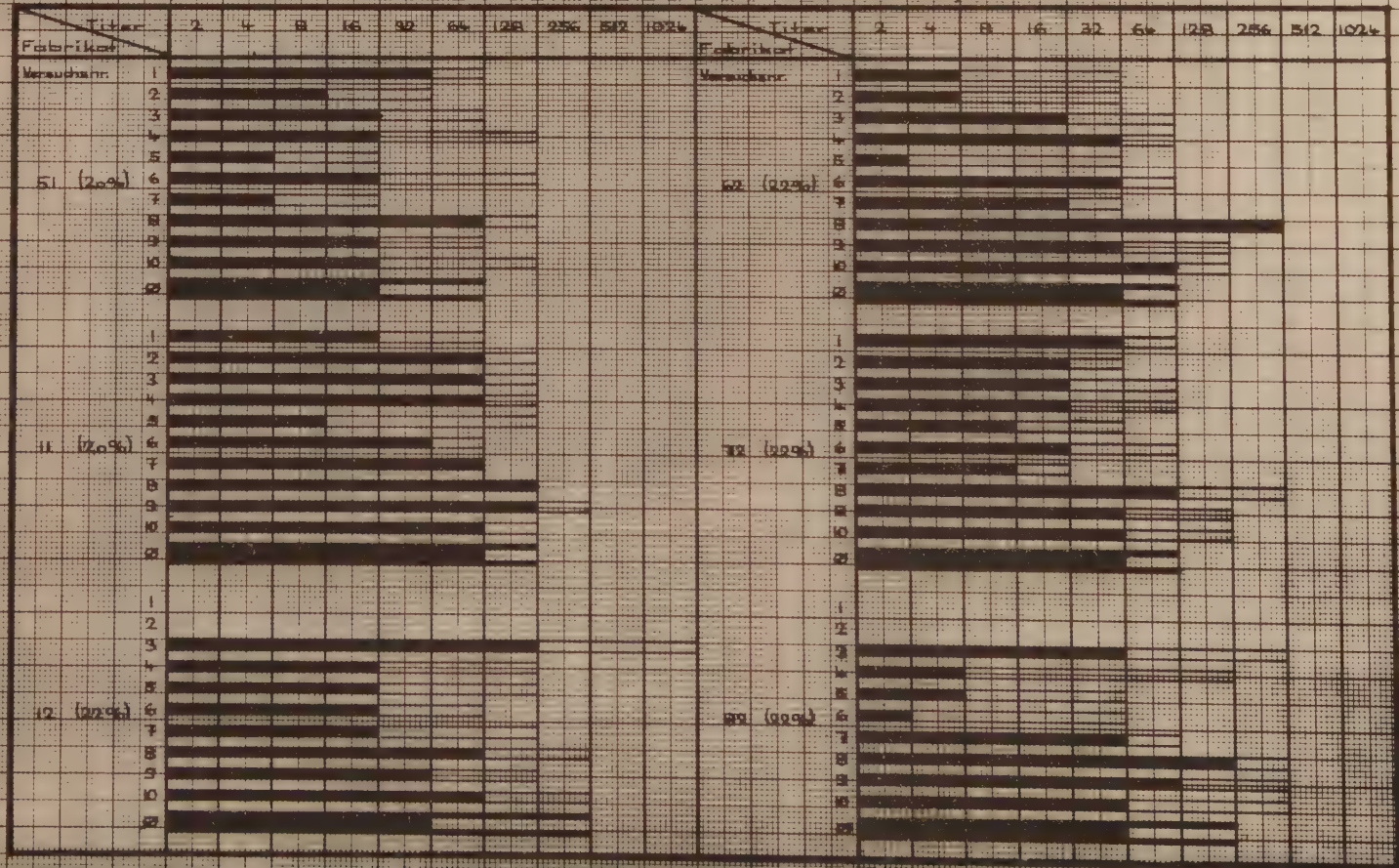
Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 3. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 20 % Rinderalbuminlösungen (Tabelle 6):

Fabrikat		51		11	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	32	64	16	64
	2	8	32	64	128
	3	16	64	64	128
	4	16	128	64	128
	5	4	16	8	128
	6	16	128	32	64
	7	4	16	64	64
	8	64	128	128	128
	9	16	64	128	256
	10	16	128	64	128
Mittelwert		19	77	63	122

Tabelle Nr 6

Darstellung der Ergebnisse des Komplexbindungs-Schnenkel-Testes der 3. Versuchsreihe
Teilergebnis: 20 und 22% Rinderalbuminlösungen
(Verwendung desselben Anti-δ-Serums und Erythrocyten verschied. Spender)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 3. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 22% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 6):

Fabrikat		12		62	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1			4	32
	2			4	32
	3	128	1024	16	64
	4	16	128	32	64
	5	16	128	2	32
	6	16	64	32	64
	7	16	128	16	32
	8	64	256	256	256
	9	32	128	32	128
	10	64	256	64	128
Mittelwert		44	264	46	83

Fabrikat		72		82	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	32	64		
	2	16	32		
	3	16	64	32	256
	4	16	64	4	128
	5	8	32	4	32
	6	16	64	2	32
	7	8	16	32	64
	8	64	256	128	256
	9	32	128	64	256
	10	32	128	32	256
Mittelwert		24	85	37	160

An den Versuchen 1 und 2 nahmen die Fabrikate 12 und 82 nicht teil

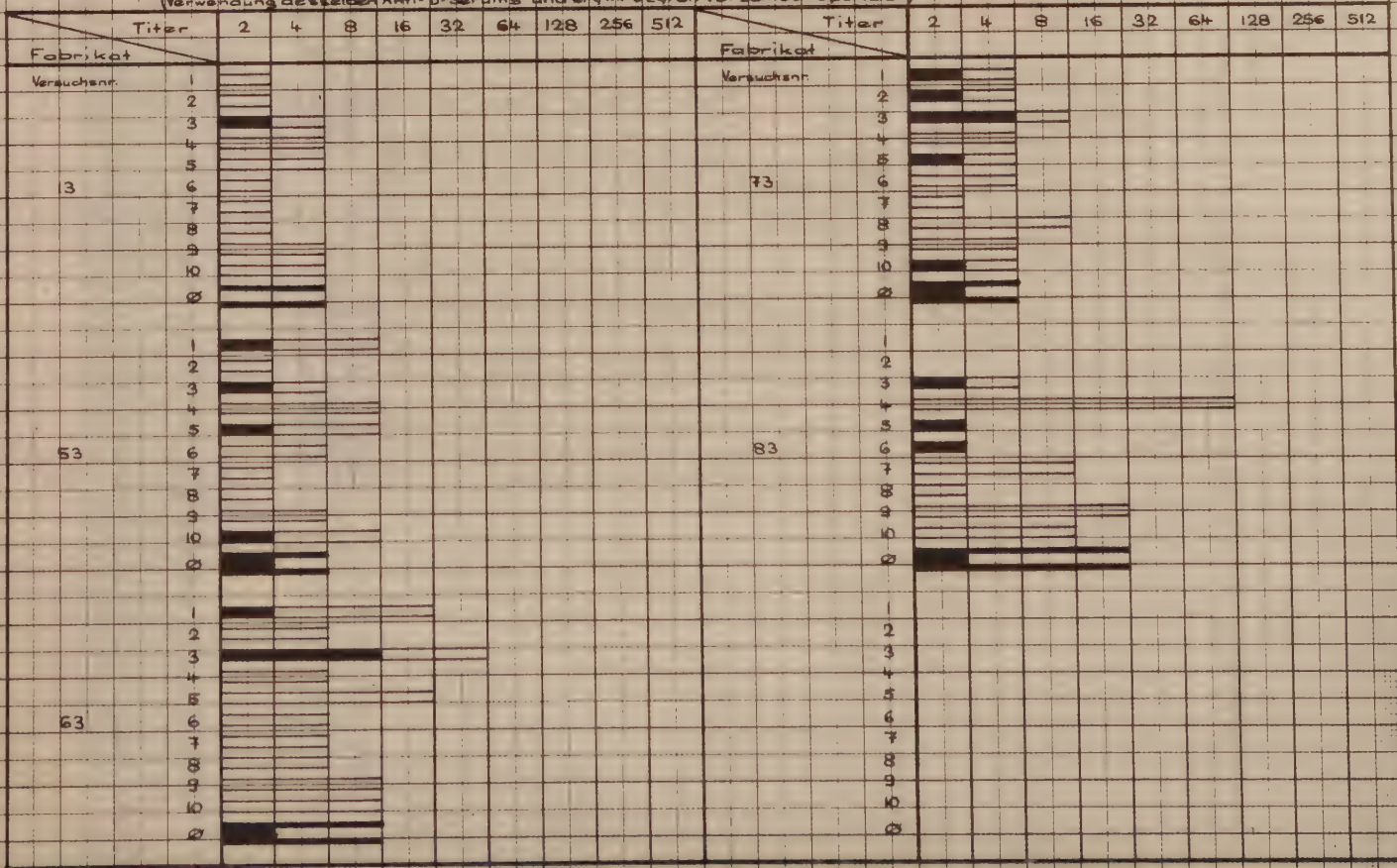
Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 3. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 30% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 7):

Fabrikat		13		53	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	-	2	2	8
	2	-	2	-	2
	3	2	4	2	4
	4	-	4	-	8
	5	-	4	2	8
	6	-	2	-	4
	7	-	2	-	2
	8	-	2	-	2
	9	-	4	-	4
	10	-	4	2	8
Mittelwert		0	3	1	5

Fabrikat		63		73	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	16	2	4
	2	-	4	2	4
	3	8	32	4	8
	4	-	4	-	4
	5	-	16	2	4
	6	-	4	-	4
	7	-	4	-	2
	8	-	4	-	8
	9	-	8	-	4
	10	-	8	2	4
Mittelwert		1	10	1	5

Tabelle Nr. 7 Darstellung der Ergebnisse des Kongluteinin-Schaukel-Tests der 3. Versuchsreihe
2. Teilergebnis: 30% Rinderalbuminlösungen
(Verwendung desselben Anti-D-Serums und Erythrocyten verschied. Spender)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 3. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 30% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 7):

Fabrikat		83	
Ablesung		makr.	mikr.
Versuchsnummer	1		
	2		
	3	2	4
	4	-	64
	5	2	2
	6	2	2
	7	-	8
	8	-	2
	9	-	16
	10	-	8
Mittelwert		1	13

Das Fabrikat 83 nahm an den ersten beiden Versuchen nicht teil.

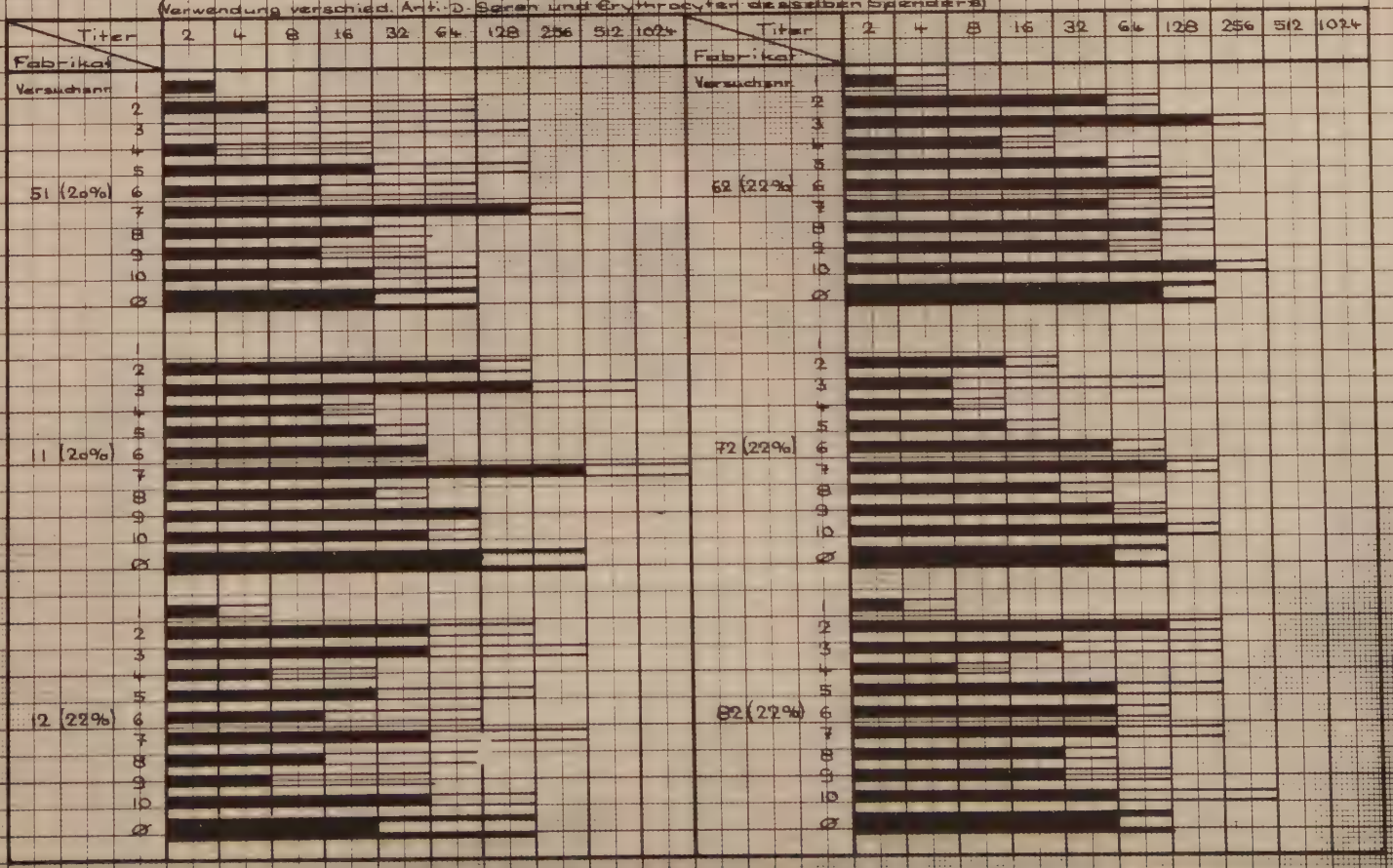
Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 4. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 20 % Rinderalbuminlösungen (Tabelle 8):

Fabrikat		51		11	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	2		
	2	4	64	64	128
	3	-	128	128	512
	4	2	16	8	16
	5	16	128	16	32
	6	8	64	32	32
	7	128	256	256	1024
	8	16	32	16	32
	9	8	32	64	64
	10	16	64	32	64
Mittelwert		20	79	68	211

Das Fabrikat 11 nahm am 1. Versuch nicht teil.

Tabelle Nr. 8 Darstellung der Ergebnisse des Kongrutinin-Schaukel-Tests der 4 Versuchsreihe
1. Teilergebnis: 20% und 22% Rinderalbuminlösungen
(Verwendung verschied. Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 4. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 22% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 8):

Fabrikat		12		62	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	4	2	4
	2	32	128	32	64
	3	32	256	128	256
	4	4	16	8	16
	5	16	128	32	64
	6	8	64	64	128
	7	32	256	32	128
	8	8	64	64	128
	9	4	32	32	64
	10	32	128	128	256
Mittelwert		17	108	52	111

Fabrikat		72		82	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1			2	4
	2	8	16	64	128
	3	4	64	16	128
	4	4	8	4	8
	5	8	16	32	128
	6	32	64	32	64
	7	64	128	32	128
	8	16	32	16	32
	9	32	64	16	64
	10	64	128	32	256
Mittelwert		26	58	25	94

Das Fabrikat 72 nahm am 1. Versuch nicht teil.

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 4. Versuchsreihe

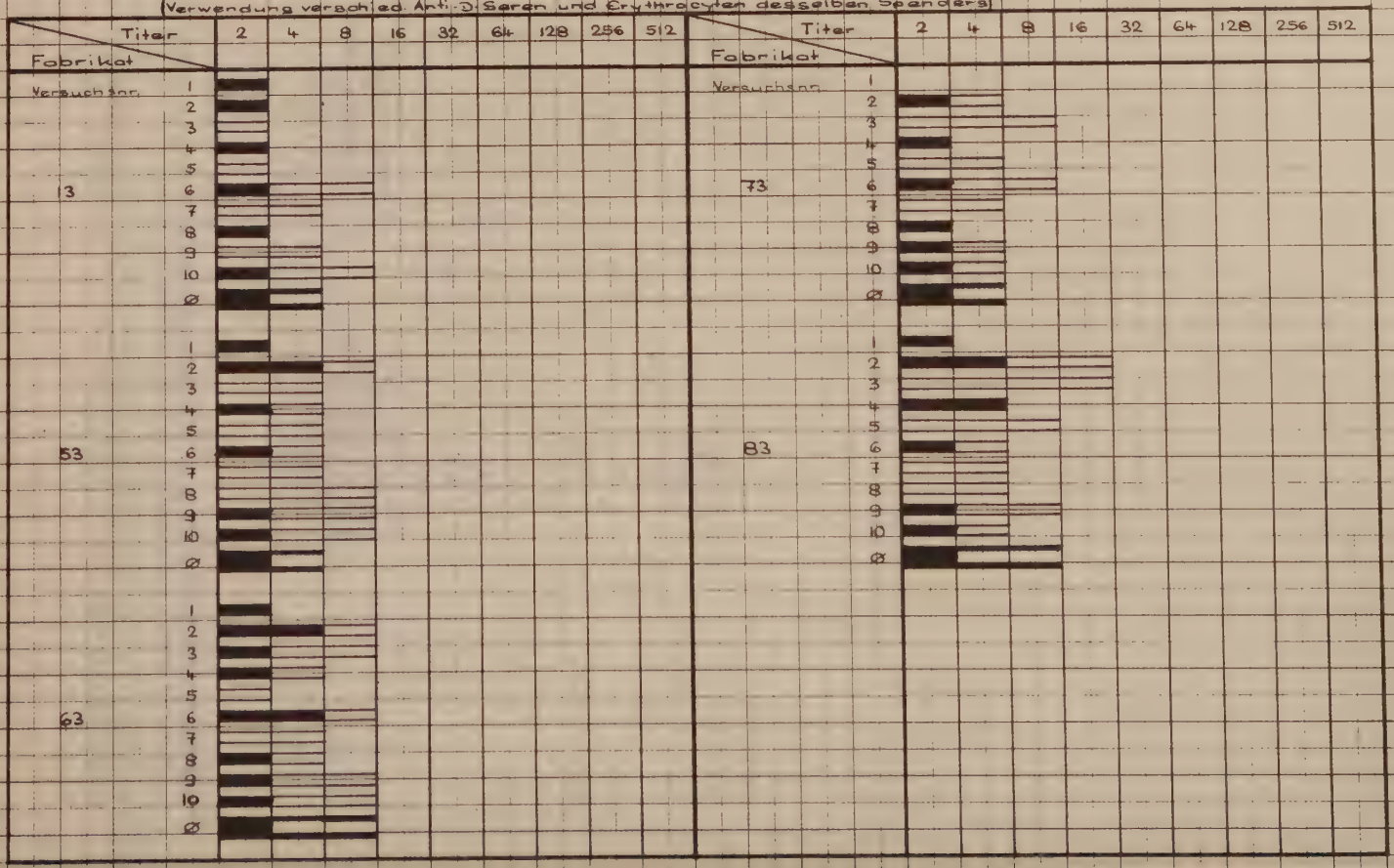
Konglutinin-Schaukel-Test mit 30% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 9):

Fabrikat		13		53	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	2	2	2
	2	2	2	4	8
	3	-	2	-	4
	4	2	2	2	4
	5	-	2	-	4
	6	2	8	2	4
	7	-	4	-	4
	8	2	2	-	8
	9	-	4	2	8
	10	2	8	2	8
Mittelwert		1	4	1	5

Fabrikat		63		73	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	2		
	2	4	8	2	4
	3	2	8	-	8
	4	2	4	2	2
	5	-	2	-	4
	6	4	8	2	8
	7	-	4	-	4
	8	2	4	2	2
	9	2	8	2	4
	10	2	8	2	4
Mittelwert		2	6	1	4

Das Fabrikat 73 nahm am 1. Versuch nicht teil.

Tabelle Nr. 9 Darstellung der Ergebnisse des Konglutinin-Schaukel-Tests der 4. Versuchsreihe
2. Teilergebnis: 30% Rinderalbuminlösungen
(Verwendung verschied. Anti-D-Seren und Erythrocyten desselben Spenders)



Zusammenstellung der Versuchsergebnisse der 4. Versuchsreihe

Konglutinin-Schaukel-Test mit 30% Rinderalbuminlösungen (Tabelle 9):

Fabrikat		83	
Ablesung		makr.	mikr.
Versuchsnummer	1	2	2
	2	4	16
	3	-	16
	4	4	4
	5	-	8
	6	2	4
	7	-	4
	8	-	4
	9	2	8
	10	2	4
Mittelwert		2	7

Zusammenstellung der Mittelwerte der 3. Versuchsreihe

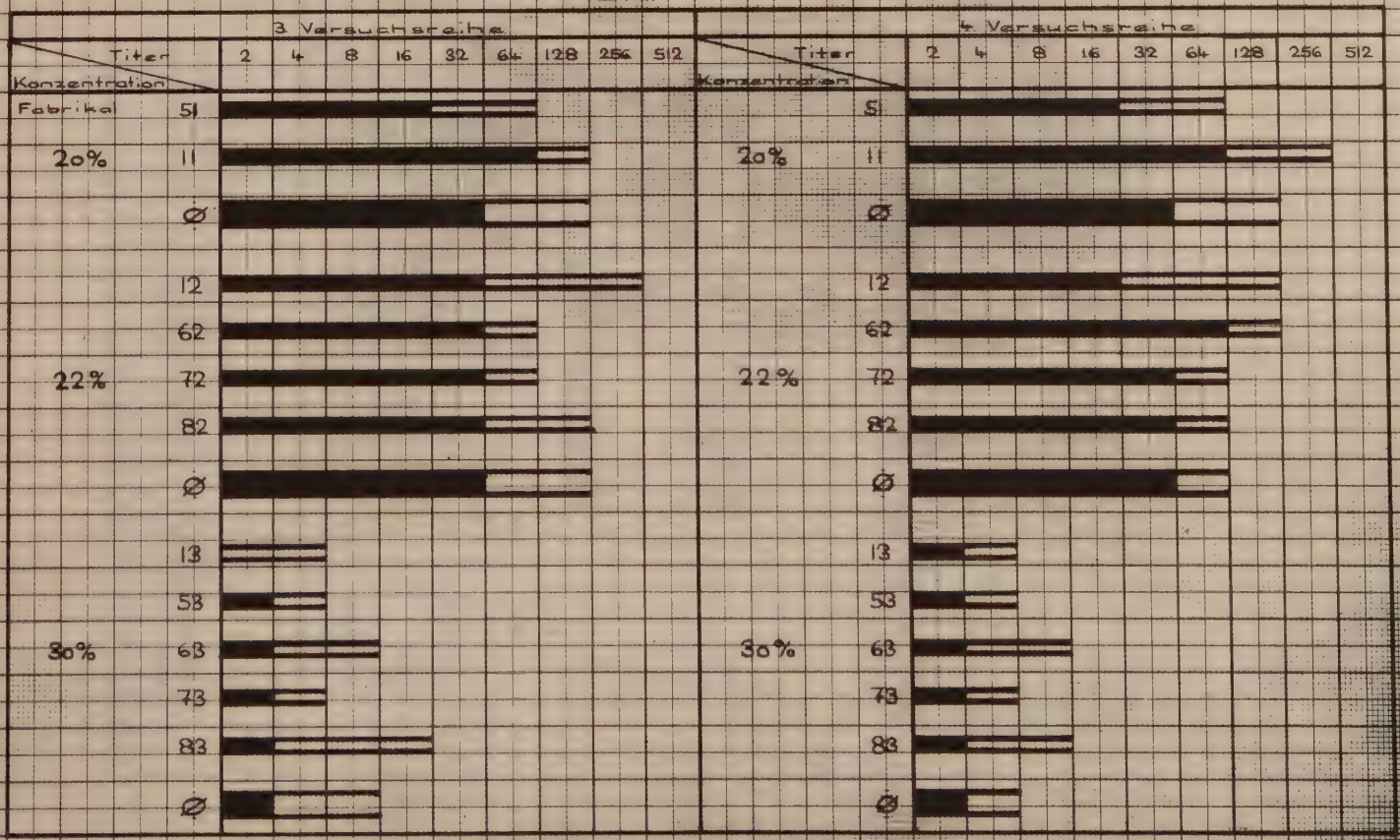
Vergleich der Mittelwerte der 3. Versuchsreihe (Tabelle 10 und 11):

Konzentration		20%		22%	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Fabrikat	51	19	77		
	11	63	122		
	12			44	264
	62			46	83
	72			24	85
	82			37	160
Mittelwert		41	100	38	148

Konzentration		30%	
Ablesung		makr.	mikr.
Fabrikat	13	0	3
	53	1	5
	63	1	10
	73	1	5
	83	1	13
Mittelwert		1	7

Tabelle Nr. 10

Zusammenstellung der Mittelwerte der Versuchsreihen 3 und 4



Zusammenstellung der Mittelwerte der 4. Versuchsreihe

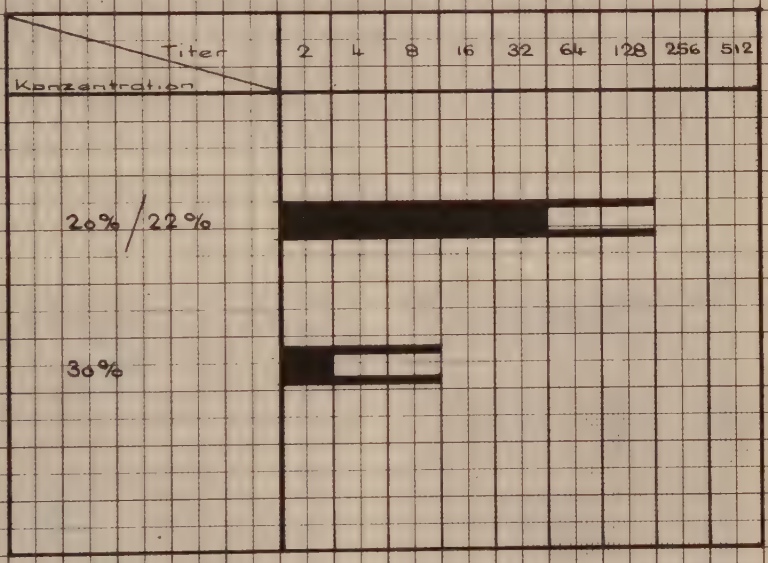
Vergleich der Mittelwerte der 4. Versuchsreihe (Tabellen 10 und 11):

Konzentration		20%		22%	
Ablesung		makr.	mikr.	makr.	mikr.
Fabrikat	51	20	79		
	11	68	211		
	12			17	108
	62			52	111
	72			26	58
	82			25	94
Mittelwert		44	145	30	93

Konzentration		30%	
Ablesung		makr.	mikr.
Fabrikat	13	1	4
	53	1	5
	63	2	6
	73	1	4
	83	2	7
Mittelwert		1	5

Tabelle Nr II

Gegenüberstellung der Gesamttiter
der Versuchsreihen 3 und 4



Abbildungs-Tabelle Nr. 12

Die Bilder zeigen die Ergebnisse von Kreuzproben auf verschiedenen Stufen zweier Verdünnungsreihen, die mit den Fabrikaten 11 (Bilder der rechten Blatthälfte) und 31 (Bilder der linken Blatthälfte) angesetzt wurden. Bei den vergleichenden Untersuchungen der 1. Versuchsreihe wurden mit dem Fabrikat 11 die empfindlichsten Ergebnisse erzielt, während sich bei verschiedenen Herstellungschargen des Fabrikates 31, die keine gerinnungshemmenden Zusätze enthielten, eine starke Pseudoagglutination ergab, die auf sämtlichen Verdünnungsstufen zu sehen war. Unter den Bildern sind die entsprechenden Titrationsstufen angegeben.

Titer 1 : 4

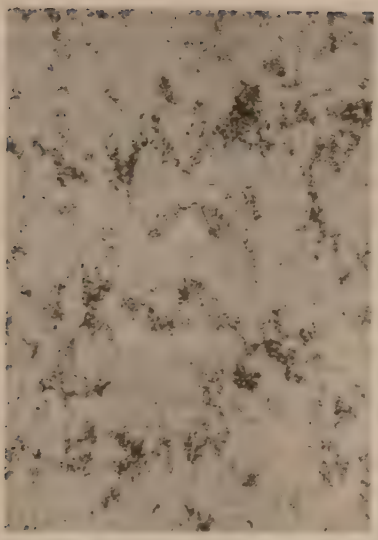
Titer 1 : 4

Titer 1 : 16

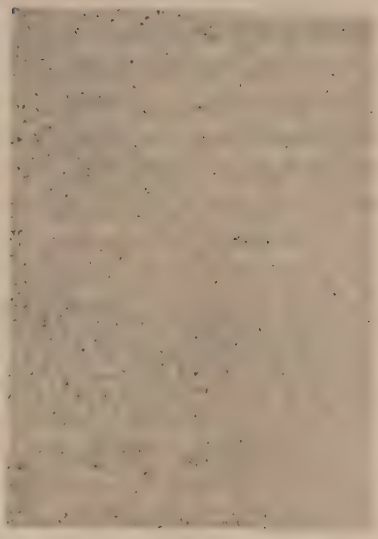
Titer 1 : 16

Titer 1 : 64

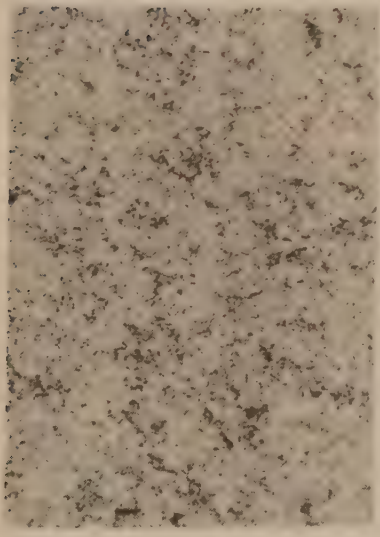
Titer 1 : 64



Titer 1 : 256



Titer 1 : 256



Titer 1 : 512

6. Diskussion

Immer mehr setzen sich Albuminlösungen durch, die zur Bestimmung inkompletter Antikörper als Konglutinin verwendet werden. Trotzdem finden sich in der Literatur nur ungefähre Angaben, in welcher Konzentration solche Lösungen Rinderalbumin enthalten sollen, um bestempfindliche Ergebnisse zu ermöglichen. Nur wenige Autoren geben für die Techniken, die sie vorschlagen, auch gleichzeitig die ihrer Ansicht nach günstigste Konzentration an. So empfiehlt Boormann und Dodd (20) eine Konzentration von 30% für den Röhrchen-Test, wenn Erythrocyten zugegeben werden, die in NaCl-Lösung suspendiert wurden. Dadurch wird dann eine endgültige Albuminkonzentration von 15% erreicht. Griffitts und Elliot (24) schlagen eine Konzentration von 30% vor für den Hoch-Protein-Slide-Test, wenn Vollblut verwandt wird. Für den Röhrchen-Test geben sie eine Konzentration von 20% an, wobei die Erythrocyten in derselben Albuminlösung suspendiert werden sollen. Kindler (25) und Gathof (30) nennen allgemein die Verwendung 20-30% Lösungen günstig, wobei sie der 20%/22% Lösung für den Objektträger-Test den Vorzug zu geben scheinen. Diamond und Denton (19), die als erste die Rinderalbuminlösungen für die Bestimmung inkompletter Antikörper benützten, verwendeten es für ihren Röhrchen-Test vorwiegend in 20% Konzentration.

Da wir die Erythrocyten in einer Rinderalbuminlösung suspendierten, lag bei unseren Versuchen die endgültige Albuminkonzentration bei Verwendung 20% Rinderalbumins bei etwa 20% und bei Verwendung 30% Lösungen bei nahe 30%. Die von der Industrie gelieferten Anti-D-Seren enthalten heute üblicherweise schon Zusätze von Rinderalbuminlösungen, deren Konzentration uns im Einzelfall nicht bekannt war. Bei diesen hochtitrigen Anti-D-Seren zeigte sich das Ende der Agglutinationsreaktion zumeist erst bei einer Verdünnung von 1 : 16 und höher. In diesen Titrationsstufen aber liegt das Anti-D-Serum mit dem Zusatz einer Rinderalbuminlösung unbekannter Konzentration in einer solchen Verdünnung vor, daß davon keine wesentliche Beeinflussung des Versuchsergebnisses erwartet werden kann.

Die Ergebnisse unserer Versuche sprechen eindeutig für die Verwendung 20%/22% Albuminlösungen. Wenn auch bei der von Boormann und Dodd angegebenen Technik, trotz des Zusatzes von 30% Rinderalbumin, eine endgültige Konzentration von 15% erreicht wird, so ist in diesem Verfahren keinerlei Vorteil zu erblicken gegenüber dem unseren, wenn man von den Nachteilen des Röhrchen-Tests, den sie vorschlagen, absieht. Andererseits wird die Zuverlässigkeit ihrer Versuchstechnik angezweifelt. Kindler (26) bezeichnet den Zusatz von NaCl-Lösung beim Arbeiten mit inkompletten Antikörpern als geradezu schädlich, da er die Agglutination verhindere.

Eine zu hohe Albuminkonzentration, wie sie bei der Verwendung 30% Lösungen gegeben ist, hemmt unserer Erfahrung nach die Ausbildung einer deutlichen Agglutination. Die Agglutinate bleiben klein und sind deshalb teilweise nur mikroskopisch zu erkennen. Außerdem zeigten die 30% Lösungen einen um 4 Stufen niedrigeren Gesamttiter gegenüber den 20%/22%. Eine weitere Beobachtung war die schlechte Ablesbarkeit der Ergebnisse: die Erythrocyten und die Erythrocyten-Agglutinate sedimentierten nur in geringem Maße und zeigten sich deshalb bei der mikroskopischen Ablesung als schlecht erkennbare, vielschichtige und durchsichtige Scheibchen.

Gerade die Verwendung 30% Rinderalbuminlösungen zeigte die Vorteile des Objektträger-Tests, da bei schwachtitrigen Anti-D-Seren oder ungeeigneten Albuminlösungen sich kleine Agglutinate bildeten, war die Ablesung der positiven Reaktion nur mikroskopisch möglich. Eine nur makroskopische Ablesung hätte ein negatives Ergebnis erbracht, was in der Praxis einen folgenschweren Irrtum bedeutet hätte. Die mikroskopische Beurteilung führt beim Röhrchen-Test zu keinen eindeutigen Ergebnissen, so daß schon von daher die Aussagen dieses Tests gegenüber dem Objektträger-Test einen geringeren Titer aufweisen. Dieser Nachteil wird dadurch noch verstärkt, daß der Hoch-Protein-Slide-Test durch die Schaukel-Technik nach W. Schneider, in seiner Empfindlichkeit gesteigert wird, wie die vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihen 1 und 2 zeigt (Tabelle 5).

Beim Vergleich der Albuminlösungen gleicher Konzentration,

die aber von verschiedenen Herstellern geliefert wurden, zeigten sich erhebliche Unterschiede in den erreichten Titerwerten. Wir führen das auf eine verschiedenartige molekulare Struktur der Albumine zurück, die ein unterschiedliches Verhalten zwischen den Antikörpern und den Antigenen bedingt. Aus diesem Grunde aber sollte eine Kreuzprobe zur Bestimmung inkompletter Antikörper stets mit zwei Albuminlösungen verschiedener Hersteller angesetzt werden, vor allem auch dann, wenn der Titerwert eines Antikörpers bestimmt wird. Diese herstellungsbedingte Unterschiede, die sich auch zwischen verschiedenen Chargen der Albuminlösungen desselben Herstellers zeigen können, lassen sich quantitativ nicht erfassen, ebensowenig wie Auswirkungen verschiedenartiger antigener Strukturen der Erythrocyten auf die Empfindlichkeit der Kreuzprobe. Dieser Umstand bedingt es, daß Angaben über die Höhe eines Antikörper-Titers nur innerhalb sehr weiter Grenzen möglich sind.

Für unbedingt erforderlich halten wir den Zusatz gerinnungshemmender Mittel zu den Albuminlösungen. Wir konnten bei drei Präparaten, die keinen solchen Zusatz enthielten, eine deutliche Beeinträchtigung der Ablesbarkeit der Ergebnisse durch Pseudoagglutination beobachten. Sie war bei zwei Albuminlösungen so stark, daß eine Kontrolle der Agglutination gar nicht möglich war, weil jede Titrationsstufe starke Pseudoagglutinate aufwies.

7. Zusammenfassung

Rinderalbuminlösungen in 20-30% Konzentration haben sich heute weitgehend durchgesetzt in der Verwendung als Konglutinin zur Bestimmung inkompletter Antikörper, besonders von Antikörpern des Rh-Systems. Wir haben versucht herauszufinden, inwieweit bei der Bestimmung von Anti-D-Antikörpern Unterschiede in der Herstellung und der Konzentration der Albuminlösungen und Unterschiede in der angewandten Kreuzprobentechnik die Empfindlichkeit der Ergebnisse beeinflussen.

Wir fanden dabei: Rinderalbumine verschiedener Herstellungschargen, aber gleicher Konzentration, ergeben Unterschiede in der Empfindlichkeit der Kreuzproben, die bei unseren Versuchsreihen durchschnittlich bis zu 3 Titerstufen betrugen. Vor allem beim Arbeiten mit schwachtitrigen Anti-D-Antikörpern sollten daher die Kreuzproben mit zwei verschiedenen Albuminlösungen durchgeführt werden, wobei für die Beurteilung der Ergebnisse eine nur makroskopische Ablesung unserer Ansicht nach unzureichend ist.

Kreuzproben, die wir nach der Konglutinin-Schaukel-Technik, die von W. Schneider angegeben wurde, durchführten, ergaben im Vergleich zur Röhrchen-Technik durchschnittlich um 2 bzw. 3 Titerstufen empfindlichere Ergebnisse. Wir führen das vor allem zurück auf die verfeinerte Versuchstechnik des Hoch-Protein-Slide-Tests und die bessere, vor allem mikroskopische Ablesbarkeit der Versuchsergebnisse beim Objektträger-Test.

Um eine einwandfreie Ablesbarkeit der Ergebnisse nicht durch eine starke Pseudoagglutination zu verhindern, halten wir den Zusatz gerinnungshemmender Mittel zu den Albuminlösungen für erforderlich. Bei drei Albuminlösungen, denen solche Zusätze fehlten, stellten wir eine teilweise grobe Verfälschung der Versuchsergebnisse durch eine Pseudoagglutination fest.

Empfindlichkeitsunterschiede in der Antikörper-Bestimung bei Verwendung von Rinderalbuminlösungen in 20% oder 22% Konzentration ließen sich nicht feststellen. Hingegen waren die Bestimmungen von Anti-D-Antikörpern mithilfe 20%/22% gegenüber 30% Rinderalbuminlösungen um durchschnittlich 4 Titer-

stufen empfindlicher, sowohl bei der makroskopischen, wie auch bei der mikroskopischen Beurteilung.

8. Literaturverzeichnis

1 Landsteiner, K: Specifity of serological reactions. Revised Edition Cambridge, Mass. (Havard Univ. Press 1945) ++

2 Landsteiner, K. und Jagić, N.: Über Reaktionen anorganischer Kolloide und Immunkörperreaktionen. Münchner Medizin. Wochenschr. 51: 1185 (1904) ++

3 Wiener, A.S.: Further observations on isosensitation to the Rh-factor. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 70: 576 (1949) ++

4 Gramlich, F.: Receptorfunktion des Erythrocyten. S. Karger, N.Y. und Basel: 9 (1966)

5 Prokop, O. und Uhlenbruck, G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. Ed. Leipzig: 305 (1963)

6 dto.: 211

7 dto.: 297

8 dto.: 232

9 Sneath, J.S. und Sneath, P.H.A.: Transformation of the Lewis groups of human red cells. Nature (London) 176: 172 (1955) and Adsorption of blood group substances from serum onto red cells. Brit. med. Bull. 15: 154 (1959) ++

10 Morgan, W.T. and Watkins, W.M.: Some aspects of the biochemistry of the human blood group substances. Brit. med. Bull. 15: 108 (1959) ++

11 Heimpel, H.: Immunhämatologie. Blut VI: 399-413 (1960)

12 Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme, Stgt.: 45 (1964)

13 Costea, N., Schwartz, R., Constantoulakis, M. and Danneshek, W.: The use of radioactive antiglobulin for the detection of erythrocyte sensitization. Blood 20: 214 (1962) ++

14 Fudenberg, H.H., Kunkel, H.G. und Franklin, E.C.: High molecular weight antibodies.
Proc. 7th Congr. intern. Soc. Blood Transf., Rom (1959): 522 ++

15 Hummel, K.: Die inkompletten Antikörper in der Immunbiologie.
G. Fischer, Stgt. (1955) ++

16 Ceppellini, R. und Landy, M.: Suppression of blood group agglutinability of human erythrocytes by certain bacterial polysaccharides.
J. Exper. Med. 117: 321 (1963) +

17 Masouredis, S.P.: Reaktion of J^{131}-trace-labelled human anti-Rh_0(D) with red cells.
J. clin. Invest. 38: 279 (1959) ++

18 Bresgen, H., Orth, G.W. und Pettenkofer, H.J.: Neugeborenen-Erythroblastose durch Anti-e.
Blut II: 48-50 (1956)

19 Diamond, L.K. und Denton, R.L.: Rh-agglutination in various media with particular reference to the value of albumin.
J. Laborat. Clin. Med. 30: 821 (1945) +

20 Boormann, K. und Dodd, B.: Blutgruppen-Serologie.
G. Fischer, Stgt.: 60 (1964)

21 Dtsch. Ges. f. Bluttransf.: Das Bluttransfusionswesen.
Schattauer, Stgt.: Ri IV: 5, 6 (1963)

22 Cornils, P.: Quantitative Leistungssteigerung des Hoch-Protein-Slide-Tests durch Bewegung des Reaktionsgemisches während der Inkubationszeit.
Inaugural-Dissertation, Tübingen, (1966)

23 Sauter, H.: Quantitativer Leistungsvergleich zwischen dem Hoch-Protein-Slide-Schaukel-Test und dem indirekten Coombs-Test im Bereich des Rh-Systems.
Inaugural-Dissertation, Tübingen, (1967)

24 Griffitts, J. und Elliott, J.: Blood bank procedures.
Dade, Miami: 68, 69 (1966)

25 Kindler, M.: Serologische Kreuzprobe vor Bluttransfusion.
Behring, Marburg, Lab. Blätter: 2 (1963)

26 dto.: 3

27 Griffitts, J. und Elliott, J.: Blood bank procedures.
Dade, Miami: 55 (1966)

28 Hässig, A.: Über die Beziehung der Hämagglutination im kolloidalen Milieu zur Geldrollenbildung, BSG und Sphärocytose.
Blut X: 297-305 (1964)

29 Rasch, L.: Lehrbuch der Blutgruppenkunde.
W. de Gruyter, Bln. (1954)

30 Gathof, A.: Blutgruppentechnik.
J.F. Lehmanns, München: 13, 16, 20-22 (1966)

Anm.: + zit. nach Prokop, O. und Uhlenbruck, G. (5)
++ zit. nach Gramlich, F. (4)

Besonderen Dank schulde ich Herrn Doz. Dr. Werther Schneider für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 20. Nov. 1940 wurde ich, Ulrich Raff, als viertes Kind des Bankkaufmanns Willy Raff und seiner Ehefrau Lydia, geb. Reeg, in Stuttgart geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich in Stuttgart die Stöckach-Volkschule und von 1951 bis 1957 die Stöckach-Mittelschule. Von 1957 bis 1959 absolvierte ich in Stuttgart eine kaufmännische Lehre und trat 1960 in das dortige Abendgymnasium ein. 1963 legte ich die Reifeprüfung ab und begann im Wintersemester 1963/64 das Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Hier legte ich 1964 die naturwissenschaftliche und 1966 die ärztliche Vorprüfung ab. Während des Wintersemesters 1967/68 studierte ich an der Universität Besancon (Frankreich) und setzte anschließend mein klinisches Studium an der Universität Tübingen fort, das ich am 5. August 1969 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19 a
Telefon 291063

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19 a
Telefon 291063